

Посвящается памяти Б.К. Вайнштейна

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА ДВУХДОМЕННОГО N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АРХЕЙНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L10 (P0) СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТОМ 23S рРНК

© 2011 г. О. В. Кравченко, И. В. Митрошин, А. Г. Габдулхаков,
С. В. Никонов, М. Б. Гарбер

Институт белка РАН, Пушкино

E-mail: garber@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 28.02.2011 г.

Боковой L12-выступ (в археях P1-выступ, в эукариотах P1/P2-выступ) является необходимым морфологическим элементом большой рибосомной субчастицы всех изученных организмов. Он образован комплексом рибосомных белков L10(P0) и L12(P1) и взаимодействует с 23S рРНК через белок L10(P0). L12(P1)-выступ вовлечен в образование ГТФазного центра рибосомы и играет важную роль во взаимодействии рибосомы с факторами трансляции. Из-за высокой подвижности данного выступа его кристаллическая структура до сих пор полностью не определена в составе рибосомы. Были получены кристаллы комплекса двухдоменного N-концевого фрагмента рибосомного белка L10(P0) из археи *Methanococcus jannaschii* со специфическим фрагментом рРНК из того же организма. Кристаллы отражают рентгеновские лучи с разрешением 3.2 Å.

ВВЕДЕНИЕ

Во всех исследованных организмах большая рибосомная субчастица содержит функционально важный боковой выступ, называемый в бактериях L12-выступ, в археях – P1-выступ и в эукариотах – P1/P2-выступ [1]. Этот боковой выступ вовлечен в образование ГТФазного центра рибосомы и играет важную роль во взаимодействии рибосомы с факторами трансляции и в контроле точности трансляции [2]. Изолированные рибосомные белки, входящие в состав данного рибосомного выступа, образуют в растворе стабильный комплекс, который через N-концевой домен белка L10(P0) связывается с большой рибосомной РНК. Архейные рибосомные белки P0 и P1 существенно отличаются от своих бактериальных гомологов L10 и L12 и близки по первичной структуре эукариотическим рибосомным белкам P0 и P1/P2. Однако РНК-связывающий домен белков L10 и P0 чрезвычайно консервативен по своей структуре и способен связываться со столь же консервативным фрагментом рибосомной РНК из любого организма. Показано, что архейный и эукариотический комплексы P0-P1 могут *in vitro* замещать в бактериальной рибосоме комплекс L10-L12, причем получившаяся гибридная рибосома начинает узнавать архейные и эукариотические факторы элонгации, но перестает узнавать свои бактериальные факторы [3].

Структура рибосомной 50S субчастицы из археи *Haloarcula marismortui* определена около десяти лет тому назад с разрешением 2.4 Å, но P1-выступ в этой модели отсутствовал полностью [4]. Позднее структура N-концевого РНК-связывающего домена белка P0(L10) была локализована в этой модели 50S субчастицы на уровне низкого разрешения [5]. Совсем недавно этот РНК-связывающий домен белка L10 визуализовали на карте электронной плотности бактериальной 70S рибосомы, сокристаллизованной с фактором элонгации EF-G [6]. Попытки определить структуру изолированных компонентов L12-выступа оказались более успешными. На данный момент известны кристаллические структуры C-концевого домена бактериального рибосомного белка L7/L12 из *E. coli* [7] и изолированного белка L12 из бактерии *Thermotoga maritima* [8]. Определена также структура комплекса белка L10 с N-концевыми доменами белка L12 из *T. maritima* [2]. Совсем недавно определили пространственную структуру комплекса белка P0 из археи *Pyrococcus horikoshii* с N-концевыми доменами белка P1 [9]. В 2010 г. определили кристаллическую структуру двухдоменного N-концевого фрагмента белка L10(P0) из гипертермофильной археи *Methanococcus jannaschii* [10]. Этот фрагмент содержит как N-концевой РНК-связывающий домен, структура которого была определена ранее и законсервирована во всех доменах жизни, так и следующий

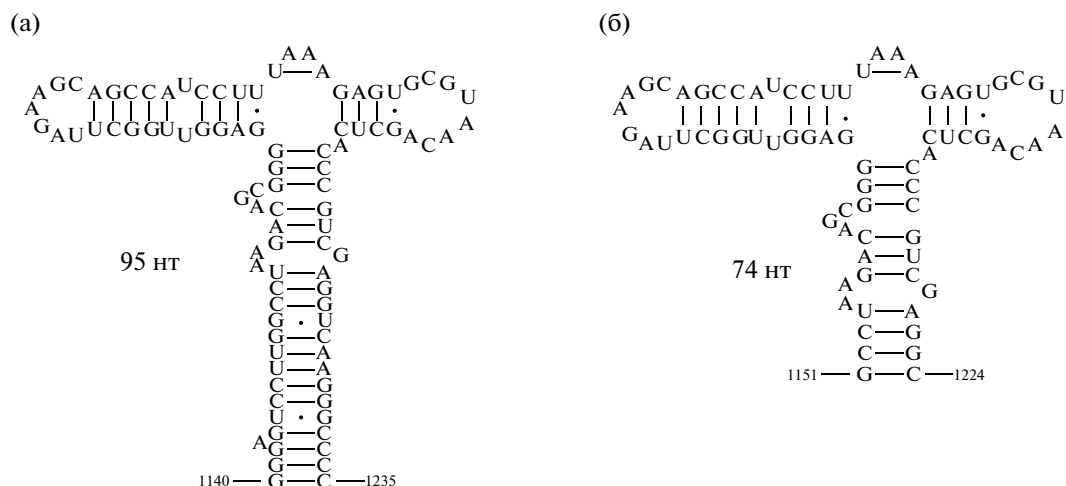


Рис. 1. Предполагаемая вторичная структура Mja 23S рРНК-95нт (а) и Mja 23S рРНК-74нт (б).

домен, который соответствует специфической вставке в аминокислотных последовательностях белка P0 из архей и эукариот, но отсутствует в бактериальном белке L10.

В данной работе описана кристаллизация комплекса двухдоменного N-концевого фрагмента белка L10(P0) из гипертермофильной археи *M. jannaschii* со специфическим фрагментом 23S рРНК. Получены кристаллы комплекса, отражающие рентгеновские лучи с разрешением 3.2 Å. Знание кристаллической структуры этого комплекса позволит уточнить модель архейной рибосомы и детально описать взаимодействия между белком L10 и рРНК.

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА L10(P0) С 95-ТИ НУКЛЕОТИДНЫМ ФРАГМЕНТОМ 23S рРНК

Поскольку полноразмерный белок L10(P0) нестабилен в растворе и с 23S рРНК взаимодействует своей N-концевой частью, был использован N-концевой фрагмент этого белка (**MjaL10NTF**) для получения и кристаллизации комплекса со специфическим фрагментом 23S рРНК.

MjaL10NTF и специфический 95-ти нуклеотидный фрагмент 23 рРНК из *M. jannaschii* (**Mja 23S рРНК-95нт**) были выделены и очищены, как описано в [10, 11].

MjaL10NTF (2.5 мг/мл в 10 mM *tris*-HCl, pH 7.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ) смешивали в молярном отношении 1 : 1 с Mja 23S рРНК-95нт (3.5 мг/мл в 10 mM *tris*-HCl, pH 7.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ) и инкубировали в течение 30 мин при температуре 4°C для образования комплекса. Предварительно препарат фрагмента рРНК прогревали при температуре 65°C в течение 10 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Для кристаллизации белка использовали метод диффузии паров в висящей капле [12]. Препарат комплекса (2 мкл) помещали в центр силиконированного покровного стекла размером 22 × 22 × 1.5 мм, затем добавляли к белку равный объем раствора осадителя, используя коммерческий набор растворов для кристаллизации (Natrix, Hampton Research). К полученной капле был добавлен цетилтриметиламмоний бромид до концентрации 0.5 mM для предотвращения агрегации комплекса. Стекло с каплей помещали над стаканчиком с 0.5 мл противораствора. Края стаканчика предварительно смазывали вакуумной смазкой. Кристаллизацию проводили при температуре 22°C. Через 3–4 дня кристаллы

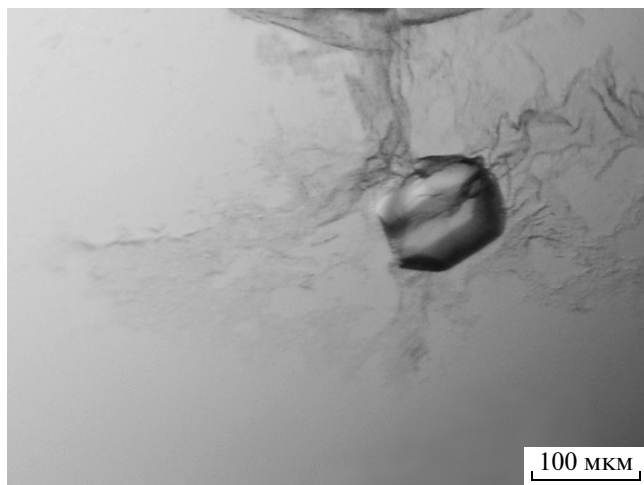


Рис. 2. Кристалл комплекса MjaL10NTF с Mja 23S рРНК-74нт.

комплекса появлялись в каплях с Natrix № 26. Данные кристаллы отражали рентгеновские лучи только в зоне низкого разрешения. Было обнаружено, что в процессе кристаллизации 95-ти нуклеотидный фрагмент 23S рРНК становится короче на несколько нуклеотидов. Для получения стабильного и гомогенного препарата РНК длинная шпилька Мжа 23S рРНК-95нт, нижняя часть которой не участвует во взаимодействии с белком L10, была укорочена на 21 нуклеотид (рис. 1). Известно, что удаление других спиралей в данном фрагменте рРНК приводит к ослаблению или полной потере связывания с белком L10 [11].

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСА Мжа L10NTF С 74-Х НУКЛЕОТИДНЫМ ФРАГМЕНТОМ 23S рРНК

Фрагмент ДНК, кодирующий L10(P0)-связывающий 74-х нуклеотидный фрагмент 23S rRNA из *M. jannaschii* (Мжа 23S рРНК-74нт), был амплифицирован с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и клонирован в вектор рUC18. Полученный ПЦР-фрагмент содержал в своем составе T7 промотор и сайты рестрикции для ферментов *NarI* и *HindIII*. Сайт рестрикции для фермента *EgeI* использовался для линеризации плазмиды перед транскрипцией. Специфический фрагмент 23S рРНК длиной 74нт нарабатывался методом транскрипции *in vitro*. Для выделения и очистки Мжа 23S рРНК-74нт использовалась методика, разработанная для Мжа 23S рРНК-95нт [11]. Формирование комплекса Мжа 23S рРНК-74нт с МжаL10NTF и его кристаллизацию выполняли, как описано для комплекса Мжа 23S рРНК-95нт с МжаL10NTF. Через 3–4 дня в тех же условиях появились кристаллы комплекса (рис. 2), которые достигали своего максимального размера в течение 1–1.5 недель. Уменьшение длины специфического фрагмента 23S рРНК с 95-ти до 74-х нуклеотидов позволило получить более упорядоченные кристаллы комплекса. На синхротро-

не Bessy (Берлин, Германия) был снят набор дифракционных данных от кристаллов комплекса МжаL10NTF с Мжа 23S рРНК-74нт с разрешением 3.2 Å. Непосредственно перед съемкой кристаллы были мгновенно заморожены при температуре 100 К в струе жидкого азота. Перед заморозкой кристаллы вымочили в течение короткого времени в криорастворе (0.05 М каодилят натрия, рН 6.5, 0.2 М KCl, 1 М ацетат магния, 15% полиэтилен гликоль 8000, 15% глицерин). В настоящее время ведется работа по определению пространственной структуры комплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы МКБ РАН, Федерального агентства по науке и инновации (ГК № 02.740.11.0295) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-00327а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liljas A., Gudkov A. // *Biochimie*. 1987. V. 69. P. 1043.
2. Diaconu M., Kothe U., Schlünzen F. et al. // *Cell*. 2005. V. 121. P. 991.
3. Nomura T., Nakano K., Maki Y. et al. // *Biochem J*. 2006. V. 396. P. 565.
4. Ban N., Nissen P., Hansen J. et al. // *Science*. 2000. V. 289. P. 905.
5. Kavran J., Steitz T. // *JMB*. 2007. V. 371. P. 1047.
6. Gao Y., Selmer M., Dunham C. et al. // *Science*. 2009. V. 326. P. 694.
7. Leijonmarck M., Liljas A. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 95. P. 555.
8. Wahl M., Bourenkov G., Bartunik H. et al. // *EMBO J*. 2000. V. 19. P. 174.
9. Naganuma T., Nomura N., Ya M. et al. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 4747.
10. Kravchenko O., Mitroshin I., Nikonov S. et al. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 399. P. 214.
11. Shcherbakov D., Dontsova M., Tribus M. et al. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 34. P. 5800.
12. Davies D., Segal D. // *Methods Enzymol.* 1971. V. 22. P. 266.